

25
PCT/E 00/00802
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND
DE 10 00 802

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 10 JUL 2000

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 11 421.8

Anmeldetag: 11. März 1999

Anmelder/Inhaber: Dyomics GmbH,
Jena/DE

Erstanmelder: Friedrich-Schiller-Universität Jena,
Jena/DE

Bezeichnung: Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe

IPC: C 09 B 23/16

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 29. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

Hoß



Beschreibung der Erfindung

Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe

Die Erfindung betrifft sogenannte Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen zur Verwendung in optischen, insbesondere fluoreszenz-optischen, Bestimmungs- und Nachweisverfahren. Typische Verfahrensanwendungen beruhen auf der Reaktion von farbstoffmarkierten Antigenen, Antikörpern oder DNA-Segmenten mit der jeweils komplementären Spezies.

Einsatzmöglichkeiten ergeben sich beispielsweise in der Medizin und der Pharmazie, in der Bio- und Materialwissenschaft, bei der Umweltkontrolle und dem Nachweis von in Natur oder Technik vorkommenden organischen und anorganischen Mikroproben sowie anderes mehr.

Polymethine sind als NIR-Marker seit langem bekannt und zeichnen sich durch intensive, leicht in den NIR-Bereich verschiebbare Absorptionsmaxima aus (Fabian, J.; Nakazumi, H.; Matsuoka, M.: *Chem.- Rev.* 1992, 92, 1197). Bei geeignetem Substituentenmuster und π -Elektronensystem fluoreszieren sie mit ausreichender Quantenausbeute auch im NIR-Bereich. Entsprechend finden diese Verbindungen breite Anwendung in verschiedenen Bereichen der Technik, als Sensibilisatoren in AgX-Materialien, als Laserfarbstoffe, als Quantenzähler, als Indikator-Farbstoffe in der Sensorik und nicht zuletzt als Biomarker („Near-Infrared Dyes for High Technology Applications“, herausgegeben von Daehne, S.; Resch-Genger, U.; Wolfbeis, O.-S., Kluwer, Academic Publishers - Dordrecht/Boston/London - 1998).

Die Anzahl der als Biomarker verwendeten Polymethine ist begrenzt. Breite kommerzielle Anwendung haben in diesem Sinne bisher nur das sich vom Astraphloxin (DE 415 534) abgeleitete Trimethin Cy3, bzw. das vinyloge Pentamethin Cy5 und das doppelt vinyloge Heptamethin Cy7 mit Absorptionsmaxima bei ca. 550 nm, ca. 650 nm und ca. 750 nm gefunden (US-PS 5 627 027). Darüber hinaus wird das polysulfonierte, vom kommerziellen Heptamethin "Indocyaningreen" bzw. "Cardio Green" abgeleitete Trimethin Cy3.5 und Pentamethin Cy5.5 angeboten (US-PS 5 569 766). In der Polymethinkette aliphatisch verbrückte Heptamethine wurden von Patonay entwickelt (US-PS 5 800 995).

Charakteristisch für alle kommerziellen Biomarker sind die sich vom Inden (Fischer-Base) bzw. Heteroinden ableitenden terminalen Heteroaromaten. Werden methylsubstituierte Cycloimonium-Salze dieses Typs als terminale Polymethin-Bausteine verwendet, so ist es notwendig, mindestens fünf aufeinander folgende sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome (Pentamethine) zwischen den Heterocyclen anzuordnen um Absorptionsmaxima an der Grenze zum NIR-Bereich zu erzeugen.

Ein wesentlicher Nachteil der als Biomarker technisch genutzten NIR-Polymethine besteht darin, daß mit Verlängerung der Polymethinkette im steigenden Maße nucleophile bzw. elektrophile Angriffsmöglichkeiten auf die Kette gegeben sind, in deren Folge es zur Zerstörung des π -Systems kommt. Neben der ungenügenden thermischen und photochemischen Stabilität besteht ein weiterer wesentlicher Mangel der Polymethine darin, daß sie neben ihren intensiven Absorptionsmaxima keine weiteren Absorptionsbanden im sichtbaren Spektralbereich aufweisen und in diesem Spektrum, insbesondere durch Argon-Laser mit einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{em} = 488$ nm oder He/Ne-Laser mit $\lambda_{em} = 633$ nm bzw. entsprechende Laserdioden ab $\lambda_{em} = 670$ nm, nicht unmittelbar angeregt werden können. Speziell die für "multiple color fluorescence assay's" geeigneten Biomarker können aber nur durch diskrete, vom π -System des Polymethins vorgegebene Lichtquellen (wie die vorgenannten) zur Anregung gebracht werden. Um dennoch derartige Anwendungen zu ermöglichen (bei der Nutzung von "multiple color fluorescence assay's" ist es notwendig mit beispielsweise einer dieser Anregungslichtquellen verschiedene Biomarker mit deutlich unterschiedlichen Emissionmaxima anzuregen), erfolgt die Anregung von Cy5 durch einen Argon-Laser, indem beispielsweise mit Hilfe von Energietransfer über die Anregung von Fluorescein \rightarrow Rhodamin \rightarrow Texas Red \rightarrow Cy5 eine Emission über die Anregung von Licht an der Grenze zum NIR-Bereich bewirkt wird (US-PS 5 800 996). Weitere Möglichkeiten zur Anregung von Cy5, beispielsweise durch einen Argon-Laser bestehen darin, Mikropartikel aus intrinsischen Fluorophoren (Phycobiliproteinen) und dem extrinsischen Cy5 zu erzeugen, die über Energiekaskaden die Anregung des bei 650 nm absorbierenden Cy5-Derivates gestatten (Szöllösi, J.; Damjanovich, S.; Matyus, L.: *Cytometry* 1998, 34, 159).

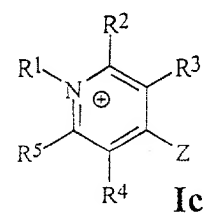
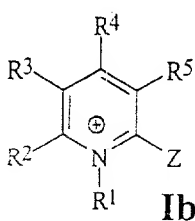
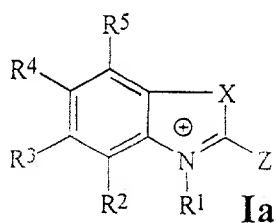
Von Gupta (US-PS 5 783 673) werden Farbstoff-Konjugate beschrieben, die durch die Reaktion von Phycobiliprotein mit aktivierten Fluorescein, Texas Red oder Cy5-Farbstoffen (Phycobiliprotein/Amine-Reactive Dye - PARD) dargestellt wurden. Diese so

erhaltenen Farbstoff-Konjugate zeigen im sichtbaren Spektralbereich zusätzliche Absorptionsbanden, die zur Anregung genutzt werden können. Nachteilig an diesen Proben sind die hohe Molmasse, die aufwendige Präparation und die geringe Stabilität dieser Marker-Farbstoffe.

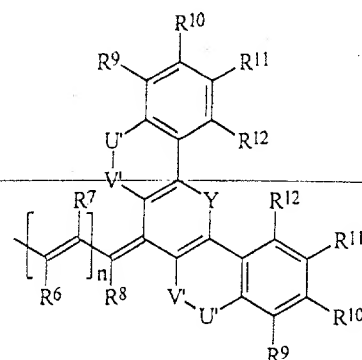
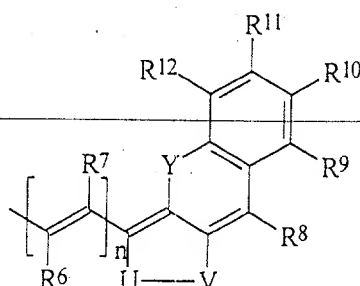
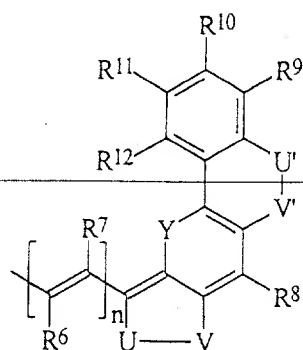
Ein weiteres Beispiel für die Anregung von an sich bei 488 nm nicht absorbierenden Pentamethinen gibt Glazer (US-PS 5 760 201). Durch die kovalente Verknüpfung mit einem im gewünschten Bereich absorbierenden Monomethin über mehrere ammoniumhaltige optimierte Alkylspacer wird zusätzlich eine starke Affinität zur DNA erreicht (spezifische Ionenbindung). Auch hier ist ein entsprechender Verfahrensaufwand zur Anregung unumgänglich. Weitere Nachteile dieser Marker-Farbstoffe bestehen in einer ungenügenden Photo- oder Lagerstabilität, in aufwendigen Synthese- und Reinigungsschritten, in geringen Absorptionskoeffizienten bzw. einer unbefriedigenden Fluoreszenzquantenausbeute sowie in unerwünschten Änderungen der optischen Eigenschaften in Gegenwart von Proteinen oder Nucleinsäureoligomeren bzw. nach Bindung an diese.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, NIR-Marker-Farbstoffe auf Polymethin-Basis mit hoher Photo- und Lagerstabilität sowie hoher Fluoreszenzausbeute zu schaffen, die auf möglichst einfache Weise durch Laserstrahlung im sichtbaren oder im nahen IR-Spektralbereich, insbesondere mit Licht eines Argon-, Helium/Neon- oder Diodenlasers zur Fluoreszenz angeregt werden können.

Erfindungsgemäß werden Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen eingesetzt, die substituierte Benzooxazol-, Benzothiazol-, 2,3,3-Trimethylindolenin-, das 2,3,3-Trimethyl-4,5-benzo- 3*H*-indolenin-, 2- und 4-Picolin-, Lepidin-, Chinaldin- sowie 9-Methylacridinderivate der allgemeinen Formeln **Ia** oder **Ib** oder **Ic**



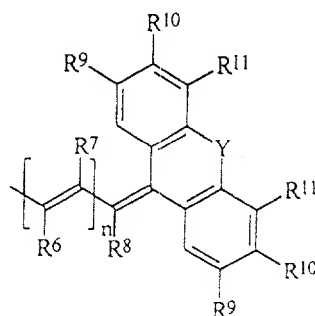
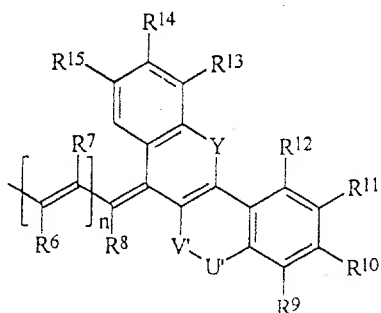
enthalten mit Z als



oder

oder

oder



oder

wobei

- X bzw. Y für ein Element aus der Gruppe O, S, Se oder das Strukturelement N-alkyl oder C(alkyl)₂ steht,
- n für die Zahlenwerte 1, 2 oder 3 steht,
- R¹ - R¹⁵ gleich oder unterschiedlich sind und Wasserstoff, ein oder mehrere Alkyl-, oder Aryl-, Heteroaryl- oder heterocycloaliphatische Reste, eine Hydroxy- oder Alkoxygruppe, eine alkylsubstituierte oder cyclische Aminfunktion sein können und/oder zwei *ortho*-ständige Reste, z. B. R² und R³, zusammen einen weiteren aromatischen Ring bilden können,
- mindestens einer der Substituenten R¹ - R¹⁵ einen ionisierbaren bzw. ionisierten Substituenten, wie SO₃⁻, PO₃⁻, COO⁻, oder NR₃⁺, darstellen kann, der die hydrophilen Eigenschaften dieser Farbstoffe bestimmt,

- mindestens einer der Substituenten R^1 - R^{15} für eine reaktive Gruppe stehen kann, welche eine kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit den oben genannten Trägermolekülen ermöglicht und
- U-V bzw. U'-V' gleich oder unterschiedlich sind und aus Wasserstoff, aus einer gesättigten aliphatischen, heteroaliphatischen oder aus einer Lacton- bzw. Thiolactongruppierung bestehen können.

In den Unteransprüchen 2-10 sind spezielle Ausführungsformen zu den Marker-Farbstoffen aufgeführt.

Diese substituierten Indol-, Heteroindol-, Pyridin-, Chinolin- oder Acridinderivate der allgemeinen Formel **Ia** oder **Ib** oder **Ic** können als Farbstoffe zur optischen Markierung von organischen oder anorganischen Mikropartikeln, z. B. von Proteinen, Nucleinsäuren, DNA, biologische Zellen, Lipiden, Pharmaka oder organischen bzw. anorganischen polymerer Trägermaterialien verwendet werden.

Die Markierung der Partikel kann dabei durch die Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zwischen den Markern der allgemeinen Formeln **Ia** oder **Ib** oder **Ic** und dem zu markierenden Materialien erfolgen.

Die gegenüber Nucleophilen aktivierten funktionellen Gruppen dieser Marker vermögen kovalent an eine OH-, NH₂- oder SH-Funktion zu koppeln. Somit entsteht ein System zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von organischen und anorganischen Materialien, wie den besagten Proteinen, Nucleinsäuren, DNA, biologische Zellen, Lipiden, Pharmaka oder organischen bzw. anorganischen Polymeren.

Diese Kopplungsreaktion kann in wässriger oder überwiegend wässriger Lösung und vorzugsweise bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Dabei entsteht ein Konjugat mit fluoreszenten Eigenschaften.

Sowohl die Verbindungen der allgemeinen Formeln **Ia** oder **Ib** oder **Ic** und davon abgeleitete Systeme können in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen, qualitativen und quantitativen Bestimmungsverfahren zur Diagnostik von Zelleigenschaften, in Biosensoren (point of care-Messungen), Erforschung des Genoms und in Miniaturisierungstechnologien eingesetzt werden. Typische Anwendungen erfolgen in der Zytometrie und Zellsortierung, der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), im Ultra-High-Troughput-Screening (UHTS), bei der multicolor Fluoreszenz-in-situ-

Hybridisierung (FISH) und in Mikroarrays (Genchips).

Durch die Darstellung von nichtsymmetrischen Polymethinen, die einerseits als terminale Funktion einen leicht derivatisierbaren Heterocyclus vom Typ der Pyridin-, Chinolin-, Indol-, Heteroindol- bzw. Acridinderivate sowie andererseits einen neuartigen 6-

Ringheterocyclus aufweisen, werden insbesondere nachfolgende Vorteile erreicht:

Bereits Trimethine absorbieren im Spektralbereich > 650 nm und zeigen eine gegenüber den bisher bekannten Polymethinen mit Absorptionsmaxima > 650 nm (Penta- und Heptamethine) eine wesentlich verbesserte photochemische und thermische Stabilität.

Durch „molecular engineering“ ist es möglich, Lage und Intensität der Absorptions- und Emissionsmaxima beliebig zu steuern und den Emissionswellenlängen unterschiedlicher Anregungslaser, vor allem NIR-Laserdioden, anzupassen.

Bedingt durch die Auswahl geeigneter terminaler Heterocyclen zeigen die erfindungsgemäßen Farbstoffe zusätzliche Absorptionsmaxima im sichtbaren bzw. NIR-Spektralbereich, die zur Anregung, beispielsweise mit einem Argon-Laser genutzt werden können. Diese Farbstoffe sind insbesondere zur Anwendung in „multiple color fluorescence assay's“ geeignet.

Die Marker-Farbstoffe sind durch relativ einfache und in zwei Stufen durchzuführende Synthese herstellbar, mit welcher eine Vielzahl unterschiedlich funktionalisierter Farbstoffe, beispielsweise hinsichtlich der Gesamtladung des Farbstoffes und der Anzahl, Spezifität und Reaktivität der zur Immobilisierung genutzten aktivierten Gruppen, anwendungsspezifisch zur Verfügung gestellt werden kann.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Es zeigen:

- Fig. 1: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 1 und 2
- Fig. 2: Synthese gemäß Ausführungsbeispiel 3
- Fig. 3: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 4 bis 6
- Fig. 4: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 7 und 8
- Fig. 5: Absorptionsspektrum von C 1601
- Fig. 6: Emissionsspektrum von C 1601 (frei, gebunden, 670 nm Diodenlaser)

- Fig. 7: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 11 und 12
Fig. 8: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 13 und 14
Fig. 9: Absorptionsspektrum von C 1591 - NHS-ester
Fig. 10: Emissionsspektrum von C 1591 (frei, gebunden, 670 nm Diodenlaser)
Fig. 11: Emissionsspektrum von C 1591 (frei, gebunden, 488 nm Ar-Ionenlaser)
Fig. 12: Synthesen gemäß Ausführungsbeispiel 19 und 20

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 3,1-verbrückten 2-(2-Ethoxyethenyl)-7-diethylamino-benzo[b]pyrylium perchloraten C 1595 und L 107, vgl. Fig. 1:

0,01 mol von einem 2-Methylen-7-diethylamin-benzo[b]pyrylium perchlorat der Formel 1a oder 1b werden in 40 ml Acetanhydrid gelöst und mit 2,0 g Triethoxymethan kurz erhitzt. Der nach ca. einer Stunde ausfallende Niederschlag wird abgesaugt und aus Eisessig umkristallisiert.

1: 6-Diethylamino-4-ethoxymethylen-1.2.3.4-tetrahydro-<dibenzo[b;e]pyrylium>

perchlorat C 1595: 3,58 g (87 %) Ausbeute, 178 °C Schmelzpunkt. ^1H NMR (CDCl_3): 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.42 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.78-1.82 (m, 2H), 2.54 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.75 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.59 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 4.53 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 6.93 (dd, $J = 2.3$, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 8.52 (s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 12.5, 15.6, 20.2, 21.8, 27.8, 45.8, 73.1, 97.1, 108.3, 115.4, 115.8, 120.3, 130.6, 145.6, 154.8, 157.8, 163.0, 167.9. - $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{ClNO}_6$ (411.88): ber. C 58.32, H 6.36, Cl 8.61, N 3.40, gef. C 57.75, H 6.58, Cl 8.43, N 3.46.

2: 3-Diethylamino-6-ethoxymethylen-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]-

naphthalen> perchlorat L 107: 3,96 g (93 %) Ausbeute, 158-60 °C Schmelzpunkt. ^1H NMR (CDCl_3): 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.75-1.77 (m, 2H), 1.85-1.87 (m, 2H), 2.58-2.61 (m, 2H), 2.79-2.83 (m, 2H), 3.58 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 4.56 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 6.99 (dd, $J = 2.4$, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 8.18 (s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 12.5, 15.5, 21.1, 23.8, 25.1, 29.2, 45.8, 72.4, 96.3, 113.2, 116.1, 116.3, 124.2, 130.8, 149.0, 155.0, 157.9, 162.8, 171.0. - $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{ClNO}_6$ (425.91): ber. C 59.22, H 6.63, Cl 8.32, N 3.29, gef. C 58.76, H 6.39, Cl 8.75, N 3.34.

3: 3-Diethylamino-6-[3-(N-acetylanilino)-prop-2-yliden]-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> perchlorat **C 1590**, vgl. Fig. 2:

2,13 g (0,005 mol) 2-Methylen-7-diethylamin-benzo[b]pyrylium perchlorat der Formel **1b** werden in 40 ml Acetanhydrid gelöst und mit 1,29 g (0,005 mol) (3-Anilinopropenyliden)-phenyl-ammoniumchlorid kurz erhitzt. Der nach ca. einer Stunde ausfallende Niederschlag wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und aus Eisessig umkristallisiert: 2,00 g (74 %) Ausbeute, 216-20 °C Schmelzpunkt. ^1H NMR (CD_3NO_2): 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.64-1.69 (m, 2H), 1.82-1.87 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 2.49 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.89 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.72 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 5.61 (dd, $J = 11.8$ Hz, $J = 13.5$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.4$ Hz, 1H), 7.36-7.39 (m, 2H), 7.54-7.65 (m, 4H), 8.21 (s, 1H), 8.27 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (CD_3NO_2): 12.8, 23.5, 25.2, 25.8, 25.9, 30.4, 47.2, 96.2, 109.9, 119.0, 119.3, 127.4, 129.9, 130.6, 130.7, 131.7, 132.0, 132.5, 140.1, 142.2, 151.3, 157.2, 160.1, 169.7, 171.2. - $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_6$ (541.04): ber. C 64.38, H 6.15, Cl 6.55, N 5.18, gef. C 63.73, H 6.15, Cl 6.81, N 5.07.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 3.1-verbrückten 2-[6-(N-acetylanilino)-hexatrien-1.3.5-yliden]-benzo[b]pyrylium und thiopyrylium perchloraten **C 1586**, **C 1573** und **C 1574**, vgl. Fig. 3:

0,005 mol von einem 2-Methylen-7-diethylamin-benzo[b]-pyrylium perchlorat der Formel **1a**, **1b** oder ein 2-Methylen-4.6-diphenyl-thiopyrylium perchlorat der Formel **1c** werden in 40 ml Acetanhydrid gelöst und mit 1,42 g (0,005 mol) (5-Anilinopenta-2.4-dienyliden)-phenyl-ammonium chlorid kurz erhitzt. Der nach ca. einer Stunde ausfallende Niederschlag wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und aus Eisessig umkristallisiert.

4: 6-Diethylamino-4-[5-(N-Acetylanilino)-penta-2.4-dienyliden]-1.2.3.4.-tetrahydro-<dibenzo[b;e]pyrylium> perchlorat **C 1586**: 2,65 g (96 %) Ausbeute, 246-48 °C Schmelzpunkt. ^1H NMR (CD_3NO_2): 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.84-1.88 (m, 2H), 2.08 (s, 3H), 2.67 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.85 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 3.72 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 5.38 (dd, $J = 11.4$ Hz, $J = 13.8$ Hz, 1H), 6.55 (dd, $J = 11.9$ Hz, $J = 14.3$ Hz, 1H), 7.00-7.08 (m, 2H), 7.27-7.33 (m, 3H), 7.56-7.62 (m, 3H), 7.71-7.75 (m, 2H), 8.00 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 8.12 (s, 1H). - $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_6$ (553.05): ber. C 65.15, H 6.01, Cl 6.41, N 5.07, gef. C 63.57, H 6.08, Cl 6.14, N 4.92.

5: 3-Diethylamino-6-[5-(N-acetylanilino)-penta-2.4-dienylidene]-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> perchlorat **C 1573**: 2,61 g (92 %) Ausbeute, 202 °C Schmelzpunkt. - ^1H NMR (CD_3NO_2): 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.78-1.82 (m, 2H), 1.90-1.94 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 2.76 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 2.95 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 3.75 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 5.39 (dd, $J = 11.3$ Hz, $J = 13.9$ Hz, 1H), 6.57 (dd, $J = 11.9$ Hz, $J = 14.3$ Hz, 1H), 6.98-7.06 (m, 2H), 7.32-7.36 (m, 3H), 7.52-7.63 (m, 4H), 7.77 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 8.22 (s, 1H). - ^{13}C NMR (CD_3NO_2): 12.3, 22.9, 25.2, 25.5, 25.7, 30.2, 46.8, 95.7, 114.5, 118.7, 119.1, 126.0, 127.7, 129.7, 130.1, 131.1, 131.5, 132.1, 137.8, 140.1, 142.1, 144.4, 150.8, 156.9, 159.8, 169.3, 170.3. - $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{ClN}_2\text{O}_6$ (567.08): ber. C 65.66, H 6.22, Cl 6.25, N 4.94, gef. C 64.42, H 6.27, Cl 6.13, N 4.78.

6: 8-[5-(N-Acetylanilino)-penta-2.4-dienylidene]-2.4-diphenyl-5.6.7.8-tetrahydro-<benzo[b]thiopyrylium>perchlorat **C 1574**: 2,37 g (79 %) Ausbeute, 216-18 °C Schmelzpunkt. - $\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{ClNO}_5\text{S}$ (600.13): ber. C 68.05, H 5.04, Cl 5.91, N 2.33, S 5.34, gef. C 67.34, H 5.03, Cl 5.67, N 2.24, S 5.18.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 3.1-verbrückten 7-Diethylamino-2-[3-(1-alkyl-3.3-dimethyl-1.3-dihydro-indol-2-yliden)-propen-1-yl]-benzo[b]pyrylium perchloraten **C 1592** und **C 1601**, vgl. Fig. 4:

In einer ersten Variante werden 0,005 mol von einem Indolderivat **2a** bzw. **2b** (Mujumdar, R. T.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S.: *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 105) zusammen mit 2,13 g (0,005 mol) **L 107** in 30 ml Acetanhydrid und 10 Tropfen Piperidin für ca. zehn Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Rohprodukt mit Ethylether gefällt und durch Säulenchromatographie (Silicagel, Methanol/Aceton 1 : 1) gereinigt.

In einer zweiten Variante kommen (wie in Fig. 4 angedeutet) anstelle von **L 107** 2,13 g (0,005 mol) von einem Perchlorat **3b** (Kanitz, A.; Hartmann, H.; Czerney, P.: *J. Prakt. Chem.* **1998**, 340, 34) zur Anwendung. Dabei ist es notwendig, die Reaktionszeit um ca. zehn Minuten zu erhöhen.

7: 3-Diethylamino-6-[2-(1-n-butyl-3.3-dimethyl-1.3-dihydro-indol-2-yliden)-ethylidenl]-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> perchlorat **C 1592**: 1,87 g (63 %) Ausbeute/Variante A, 1,34 g (45 %) Ausbeute/Variante B, 216-18 °C Schmelzpunkt. - HRMS-FAB ($C_{34}H_{43}N_2O$): ber. 495.337539; gef. 495.335970; D = 1.569 mmU.

8: 3-Diethylamino-6-<2-[1-(4-sulfonatobutyl)-3.3-dimethyl-5-sulfonato-1.3-dihydro-indol-2-yliden]-ethylidenl>-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen>kalium **C 1601**: 1,25 g (36 %) Ausbeute, 216-18 °C Schmelzpunkt - HRMS-FAB ($C_{34}H_{42}KN_2O_7S_2$): ber. 693.207053; gef. 693.203060; D = 3.99 mmU.

9: *Absorptionsspektren von C 1601*: Fig. 5 zeigt das Absorptionsspektrum von **C 1601** in reinem PBS (Phosphate Buffer Saline) und nach der Zugabe von Albumin aus Humanserum (HSA).

10: *Fluoreszenzspekten von C 1601*: Fig. 6 zeigt die Emissionsspektren von **C 1601** (angeregt durch einen 670 nm Diodenlaser) in reinem PBS und nach der Zugabe von HSA. Die Intensität der Fluoreszenz hat sich nach der Zugabe von HSA um den Faktor fünf verstärkt.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 3.1-verbrückten 7-Diethylamino-2-[3-(1-(5-carboxypentyl-3.3-dimethyl-5-sulfonato-1.3-dihydro-indol-2-yliden)-propen-1-yl]-benzo[b]pyrylium perchloraten C 1602 und C 1591, vgl. Fig. 7:

1,77 g (0,005 mol) von einem Indolderivat **2c** (Mujumdar, R. T.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S.: *Bioconjugate Chem.* 1993, 4, 105) und 0,005 mol **C 1595** bzw. **L 107** werden in 40 ml einer Mischung aus Pyridin/Acetanhydrid (1/1) für ca. zehn Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Rohprodukt mit Ethylether gefällt und durch Säulenchromatographie (Silicagel, Methanol) gereinigt.

11: 6-Diethylamino-4-<2-[1-(5-carboxypentyl)-3.3-dimethyl-5-sulfonato-1.3-dihydro-indol-2-yliden]-ethylidenl>-1.2.3.4-tetrahydro-<dibenzo[b,e]pyrylium> betain **C 1602**: 2,20 g (71 %) Ausbeute, >310 °C Schmelzpunkt. - $C_{35}H_{44}KN_2O_7S$ ($657.89 \cdot H_2O$): ber. C 62.20, H 6.56, N 4.14, S 4.74, gef. C 61.74, H 6.53, N 4.06, S 4.26. - HRMS-FAB

(C₃₅H₄₃N₂O₆S): ber. 619.284184; gef. 619.286390; D = -2.205 mmU.

12: 3-Diethylamino-6-<2-[1-(5-carboxypentyl)-3.3-dimethyl-5-sulfonato-1.3-dihydro-indol-2-yliden]-ethylidenl>-7.8.9.10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> betain **C 1591**: 2,15 g (68 %) Ausbeute, >340 °C Schmelzpunkt. - C₃₆H₄₆KN₂O₇S (671.91 * H₂O): ber. C 62.68, H 6.73, N 4.06, S 4.64, gef. C 62.37, H 6.61, N 4.07, S 4.34. - HRMS-FAB (C₃₆H₄₅N₂O₆S): ber. 633.299834; gef. 633.308710; D = -8.875 mmU.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von **NHS-ester** mit *N*-Hydroxysuccinimid (**NHS**)/*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (**DCC**), vgl. Fig. 8:

15 mg **C 1602** bzw. **C 1591**, 14 mg **DCC** und 4 mg **NHS** werden in 1 ml trockenem DMF gelöst und mit 10 µl Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird der Rückstand mit Ether gewaschen und am Ölpumpenvakuum getrocknet.

13: **C 1602-NHS-ester**: Die Reaktion verläuft quantitativ.

14: **C 1591-NHS-ester**: Die Reaktion verläuft quantitativ.

15: Kovalente Markierung von Albumin aus Humanserum (**HSA**) mit **C 1591-NHS-ester**: **C 1591-NHS-ester** (ca. 0,5 mg) werden in 50 µl DMF und 5 mg **HSA** in 750 µl Bicarbonatpuffer (0.1 mol/l, pH = 9.0) gelöst. Beide Lösungen werden langsam vereint und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das markierte **HSA** durch Gelchromatographie vom nicht gebundenen Farbstoff getrennt. Als stationäre Phase dient Sephadex G50, als Laufmittel Phosphatpuffer (22 mmol/l, pH 7.2).

16: Absorptionsspektren von **C 1591-Derivaten**: Fig. 9 zeigt das Absorptionsspektrum von einem aktivierten **C 1591-NHS-ester** und **C 1591** kovalent gebunden an **HSA**. Als Lösungsmittel wurde für beide Messungen PBS (Phosphate Buffer Saline) verwendet.

17: Fluoreszenzspektren von **C 1591-Derivaten**: Fig. 10 zeigt das Emissionsspektrum von einem aktivierten **C 1591-NHS-ester** und **C 1591** kovalent gebunden ans **HSA**. Zur Anregung wurde ein 670 nm Diodenlaser (Spindler & Hoyer, Leistung max. 3 mW)

verwendet. Als Lösungsmittel für beide Messungen diente PBS.

18: *Fluoreszenzspektren von C 1591-Derivaten*: Fig. 11 zeigt das Emissionsspektrum von einem aktivierten **C 1591-NHS-ester** und **C 1591** kovalent gebunden an HSA.

Zur Anregung wurde ein 488 nm Ar-Ionenlaser (*Ion Laser Technology*, Leistung max. 100 mW) verwendet. Als Lösungsmittel für beide Messungen diente PBS.

19: *3-Diethylamino-6-<2-[1-(3-acetoxypentyl)-3,3-dimethyl-1,3-dihydro-indol-2-yliden]-ethyliden>-7,8,9,10-tetrahydro-6H-<5-oxonia-cyclohepta[b]naphthalen> perchlorat C 1594*, vgl. Fig. 12:

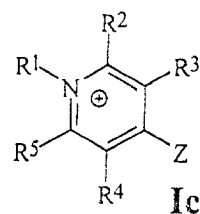
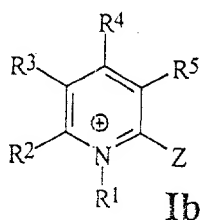
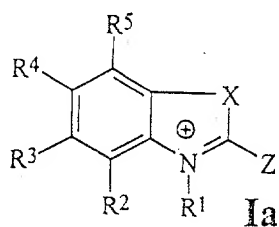
1,94 g (0,005 mol) 1-(1-Acetoxypentyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolinium iodid **2d** (*Brush et al.*, US-PS 5 808 044) und 2,13 g (0,005 mol) **L 107** werden in einer Mischung aus jeweils 20 ml Pyridin und 20 ml Acetanhydrid ca. 20 Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die noch acetylierte Zwischenstufe mit Ether gefällt und im Vakuum getrocknet. Die Reinigung des Produktes erfolgt durch präparative Säulenchromatographie (Silicagel, Methanol). 0,87 g (29 %) Ausbeute, 155-62 °C Schmelzpunkt. - HRMS-FAB ($C_{35}H_{43}N_2O_3$): ber. 539.327368; gef. 539.328510; D = -1.142 mmU.

20: *Darstellung vom C 1594-phosphoramidit*, vgl. Fig. 12:

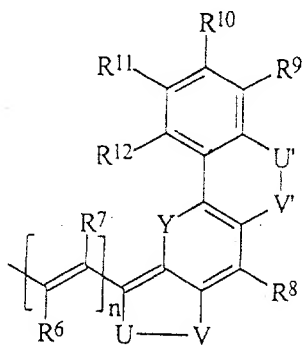
Zur Hydrolyse werden 200 mg **C 1594** in 10 ml Methanol gelöst und unter Zugabe von 50 mg Natriumcarbonat zwei Stunden gerührt. Im Anschluß daran wird filtriert sowie der entacylierte Farbstoff durch Zugabe von Ether ausgefällt und getrocknet. Das erhaltene Produkt wird in trockenem DMF gelöst und mit 0.15 ml *N,N*-Diisopropylamin versetzt. Zu dieser Lösung gibt man im Verlauf einer Stunde dreimal je 40 µl 2-Cyanoethyl-*N,N*-Diisopropylchlorophosphoramidit. Dabei wird der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt und nach quantitativem Ablauf der Reaktion das Produkt direkt zum Markieren von DNA eingesetzt.

Patentansprüche

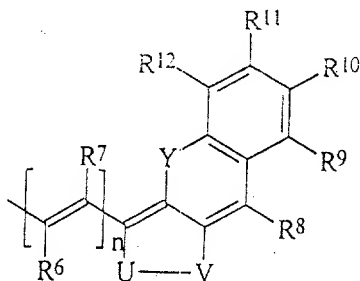
1. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen, enthaltend substituierte Benzooxazol-, Benzothiazol-, 2,3,3-Trimethylindolenin-, das 2,3,3-Trimethyl-4,5-benzo- 3H-indolenin-, 2- und 4-Picolin-, Lepidin-, Chinaldin- sowie 9-Methylacridin-derivate der allgemeinen Formeln Ia oder Ib oder Ic



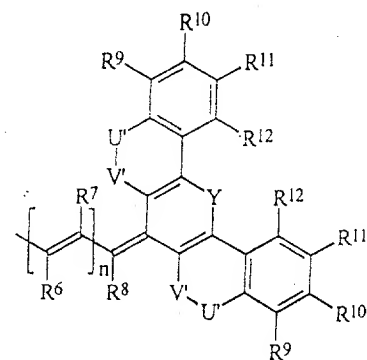
mit Z als



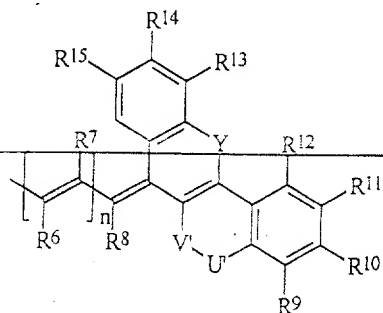
oder



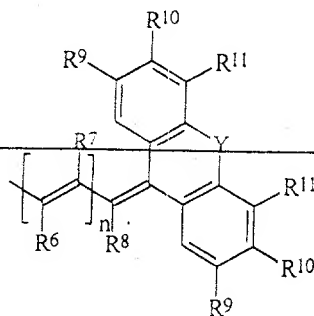
oder



oder



oder



wobei

- X bzw. Y für ein Element aus der Gruppe O, S, Se oder das Strukturelement N-alkyl oder C(alkyl)₂ steht,

- n für die Zahlenwerte 1, 2 oder 3 steht,
- $R^1 - R^{15}$ gleich oder unterschiedlich sind und Wasserstoff, ein oder mehrere Alkyl-, oder Aryl-, Heteroaryl- oder heterocycloaliphatische Reste, eine Hydroxy- oder Alkoxygruppe, eine alkylsubstituierte oder cyclische Aminfunktion sein können und/oder zwei *ortho*-ständige Reste, z. B. R^2 und R^3 , zusammen einen weiteren aromatischen Ring bilden können,
- mindestens einer der Substituenten $R^1 - R^{15}$ einen ionisierbaren bzw. ionisierten Substituenten, wie SO_3^- , PO_3^- , COO^- , oder NR_3^+ , darstellen kann, der die hydrophilen Eigenschaften dieser Farbstoffe bestimmt,
- mindestens einer der Substituenten $R^1 - R^{15}$ für eine reaktive Gruppe stehen kann, welche eine kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit den oben genannten Trägermolekülen ermöglicht und
- U-V bzw. U'-V' gleich oder unterschiedlich sind und aus Wasserstoff, aus einer gesättigten aliphatischen, heteroaliphatischen oder aus einer Lacton- bzw. Thiolactongruppierung bestehen können.

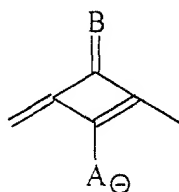
2. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktive Gruppe aus folgenden Funktionalitäten ausgewählt ist: Isothiocyanate, Isocyanate, Monochlortriazine, Dichlortriazine, Aziridine, Sulfonylhalogenide, N-Hydroxysuccinimidester, Imido-Ester, Glyoxal oder Aldehyd für Amin- und Hydroxy-Funktionen bzw. Maleimide oder Iodacetamide für Thiol-Funktionen sowie Phosphoramidite für die Markierung der DNA oder RNA oder deren Bruchstücke.

3. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktive Gruppe über Spacer-Gruppen der allgemeinen Struktur $-(CH_2)_m-$ am eigentlichen Chromophor gebunden ist, wobei m Werte von 1 bis 18 annehmen kann.

4. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit $=CR^7-$ auch eine Verbrückung über vier-, fünf- und sechsgliedrige Ringsysteme beinhaltet, wobei sich an dieser auch reaktive Gruppen befinden und die

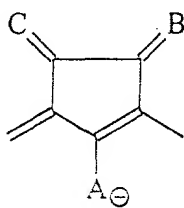
Substituenten A - G die gleiche Funktionalität wie die Substituenten R^1 - R^{15} besitzen können.

5. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit $=CR^7$ - ($n = 2$) für



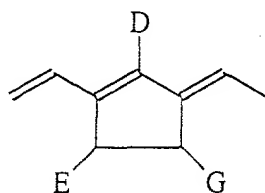
steht.

6. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit $=CR^7$ - ($n = 2$) für



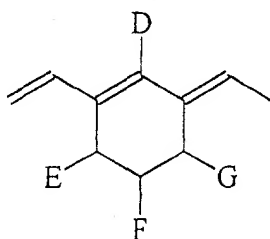
steht.

7. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit $=CR^7$ - ($n = 3$) für



steht.

8. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit $=CR^7$ - ($n = 3$) für



steht.

9. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Substituenten A - C für O, S, C(CN)₂ bzw. N-R stehen, wobei R in N-R für einen aliphatischen oder aromatischen bzw. einem reaktiven aliphatischen oder aromatischen Rest, wie (CH₂)_nCOOH oder (CH₂)_nNH₂, stehen kann.

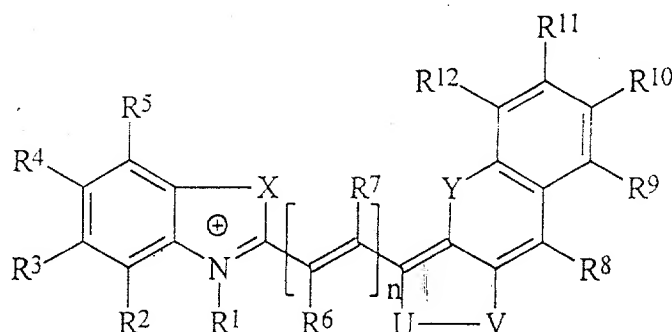
10. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Substituent D für Cl oder ein aromatisches bzw. aliphatisches Ringsystem steht, an dem gegebenenfalls reaktive Substituenten entsprechend den R¹ bis R¹⁵ angebracht sind.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft sogenannte Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen zur Verwendung in optischen, insbesondere fluoreszenz-optischen, Bestimmungs- und Nachweisverfahren, beispielsweise in der Medizin, in der Pharmazie sowie in der Bio-, Material- und Umweltwissenschaft.

Aufgabe war es, NIR-Marker-Farbstoffe auf Polymethin-Basis mit hoher Photo- und Lagerstabilität sowie hoher Fluoreszenzausbeute zu schaffen, die auf möglichst einfache Weise durch Laserstrahlung im sichtbaren oder NIR-Spektralbereich, insbesondere mit Licht eines Argon-, Helium/Neon- oder Diodenlasers, zur Fluoreszenz angeregt werden können.

-) Erfindungsgemäß werden Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen der allgemeinen Formel



eingesetzt.

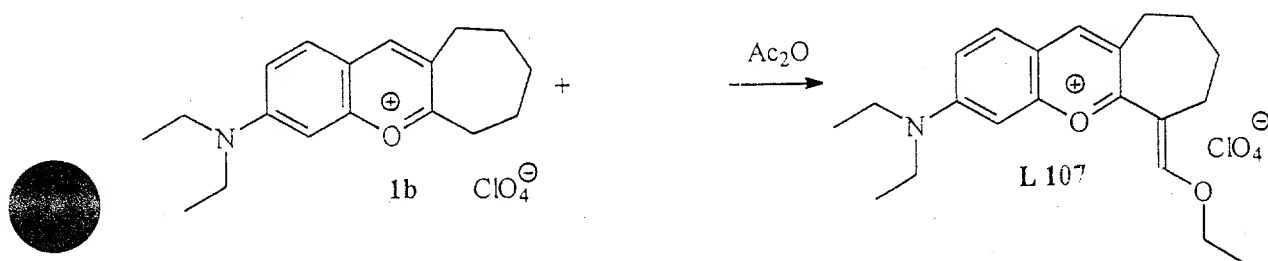
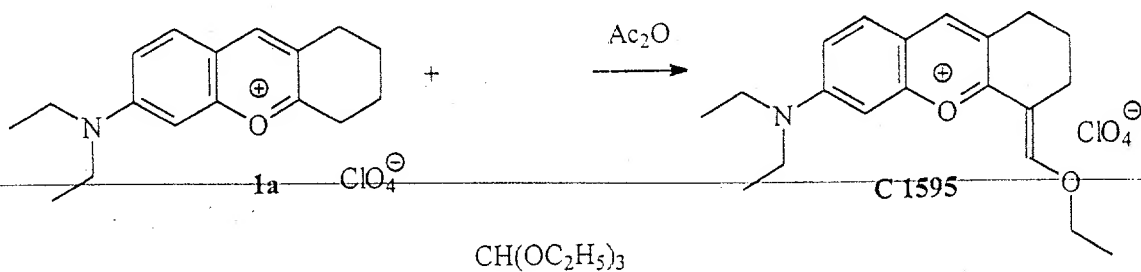


Fig. 1

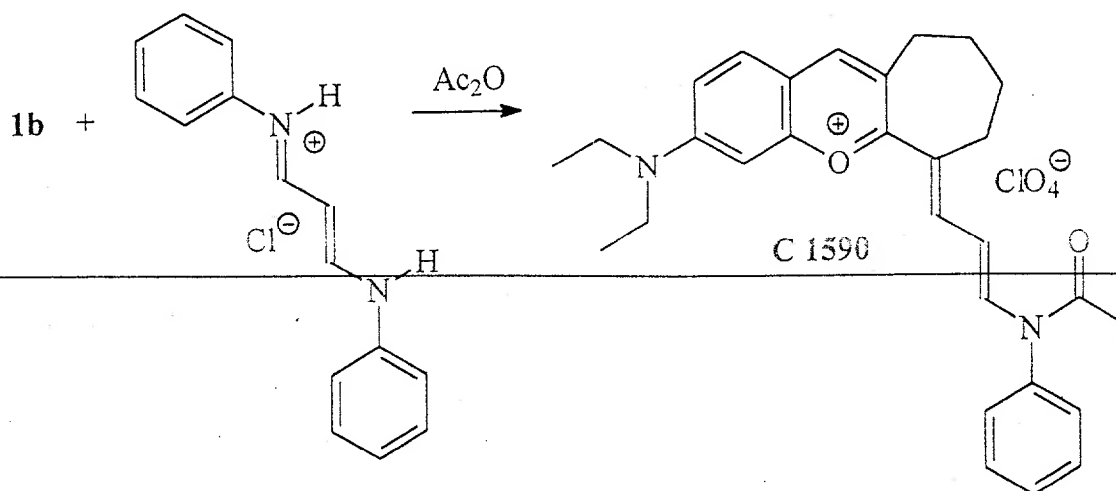


Fig. 2

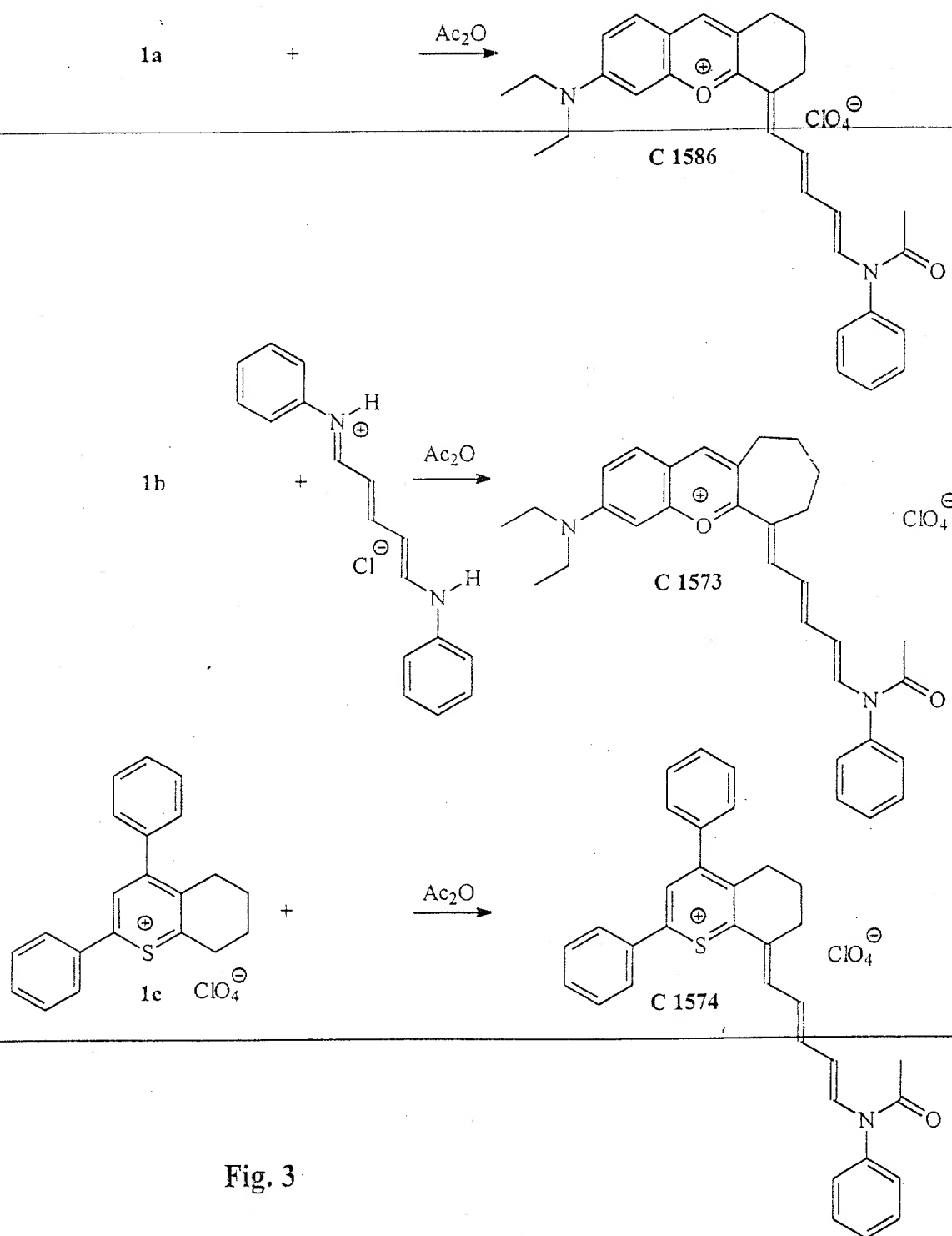


Fig. 3

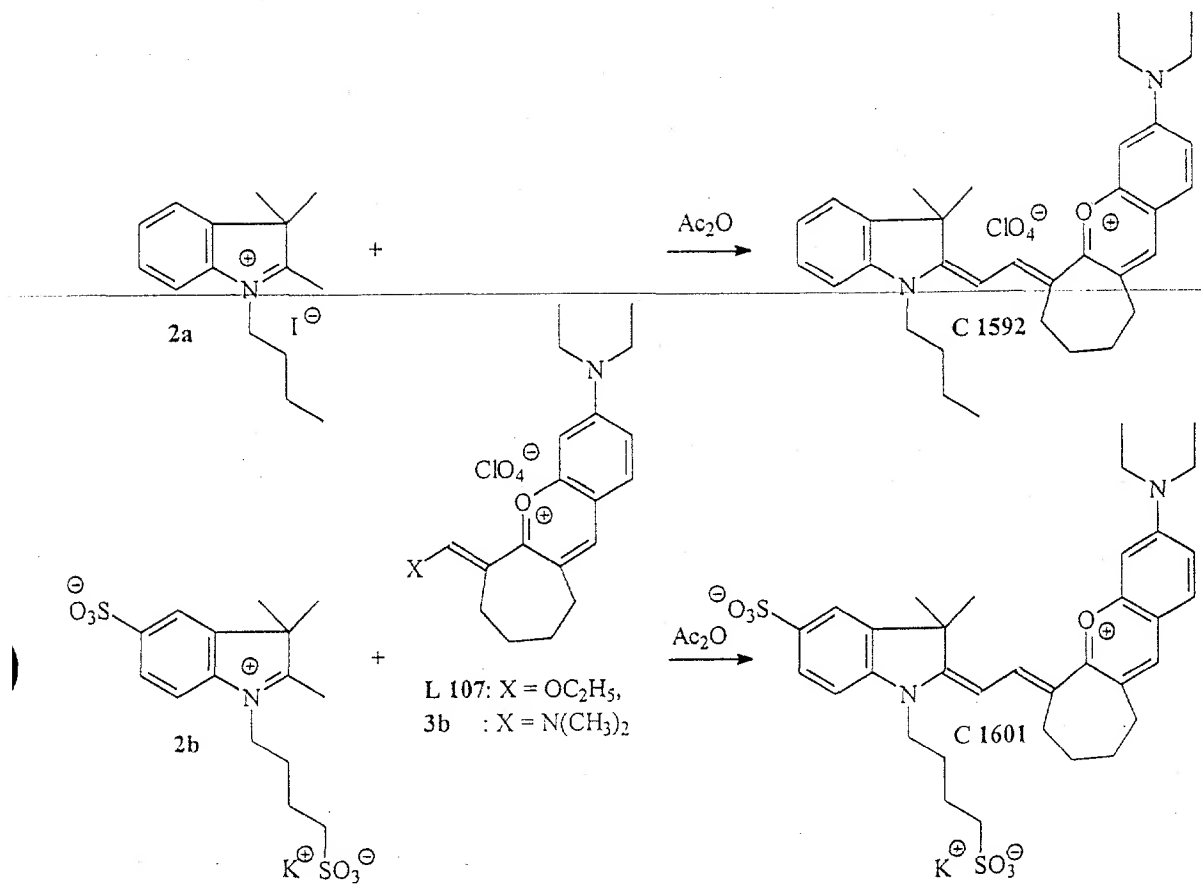


Fig. 4

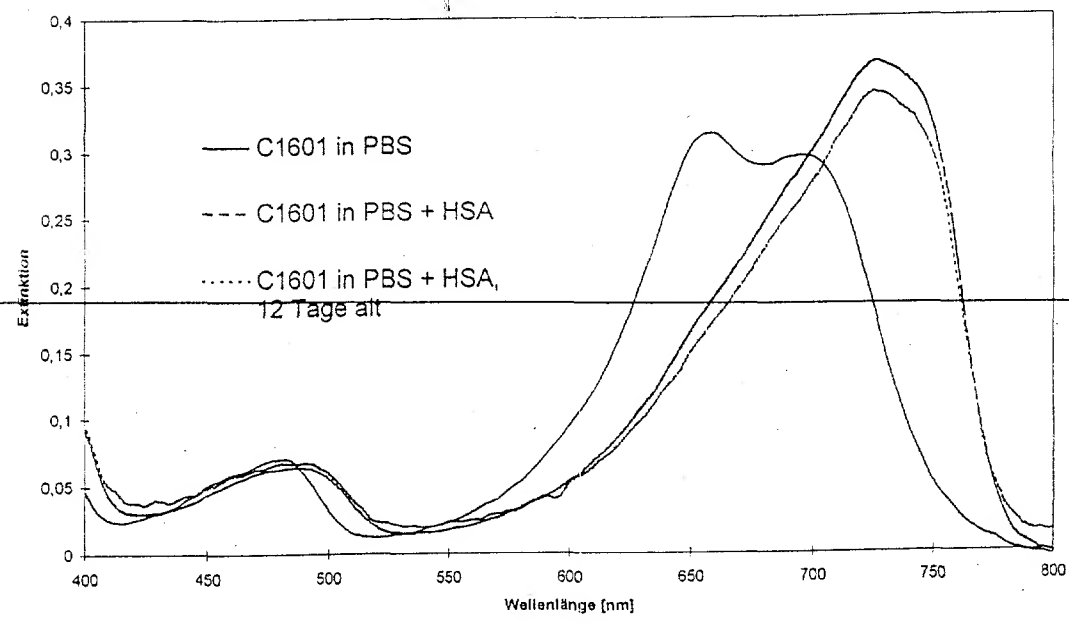


Fig. 5

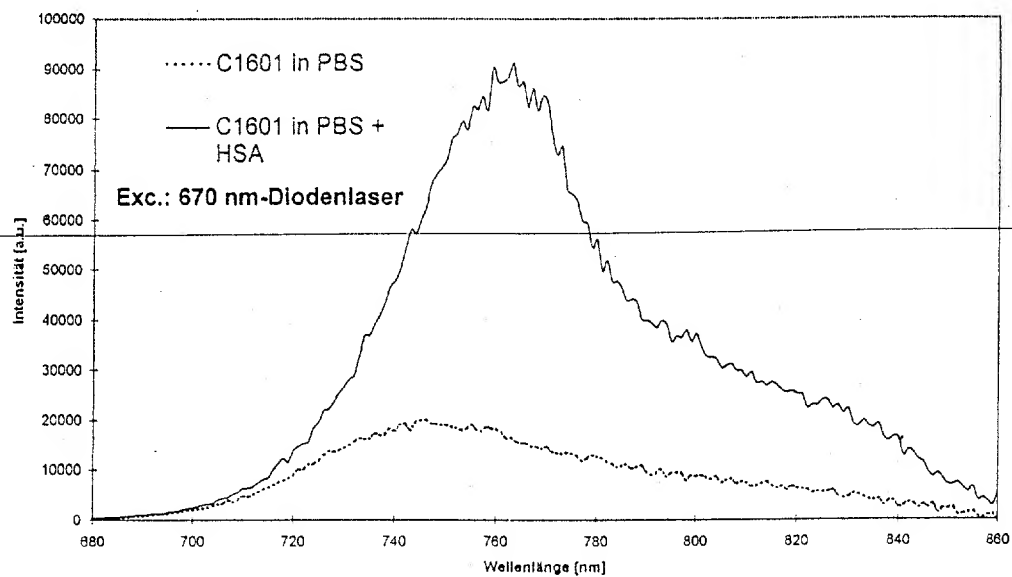


Fig. 6

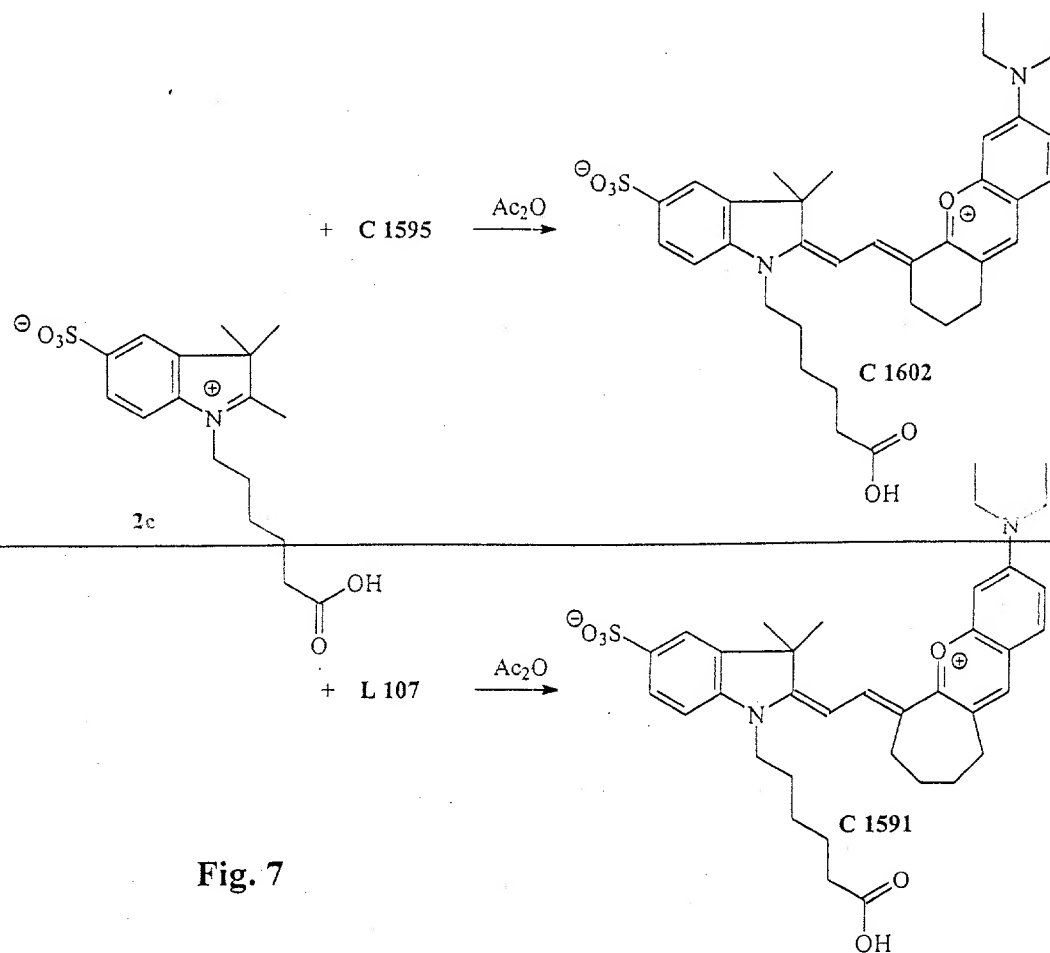


Fig. 7

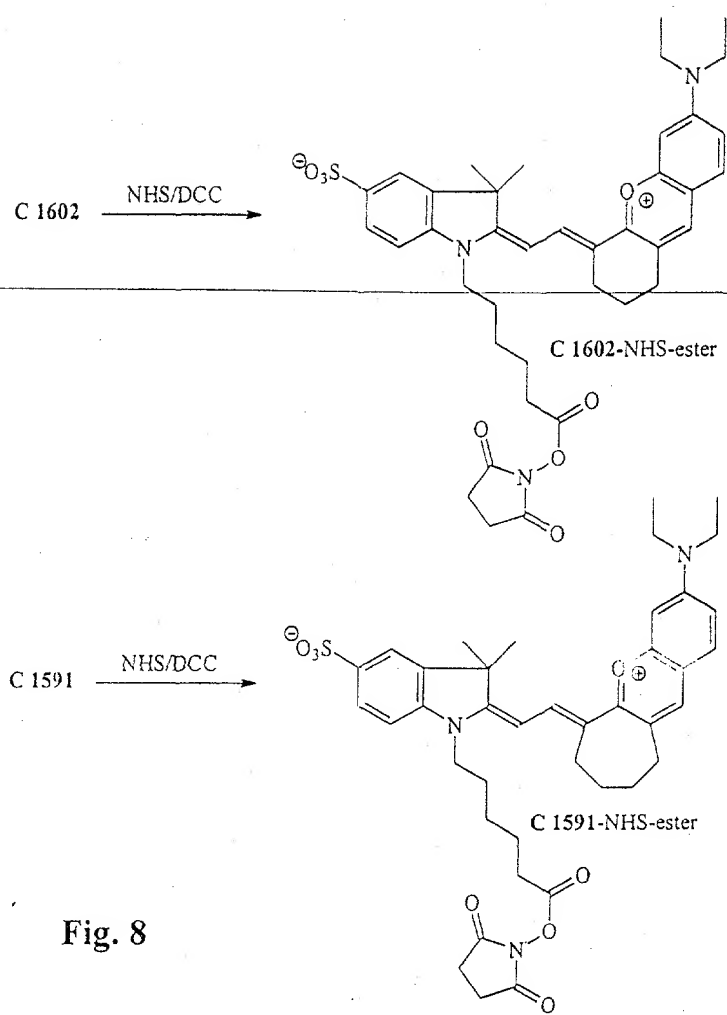


Fig. 8

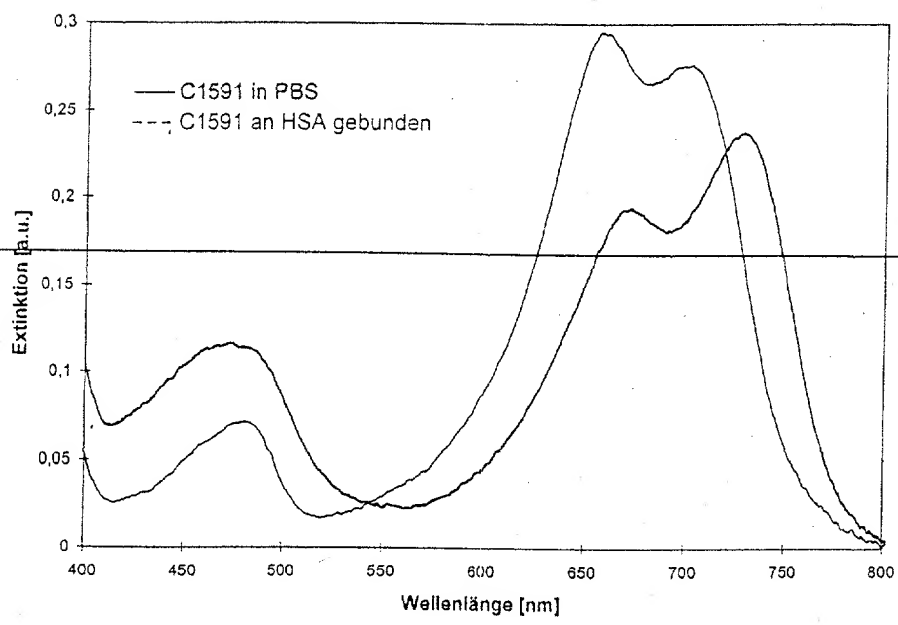


Fig. 9

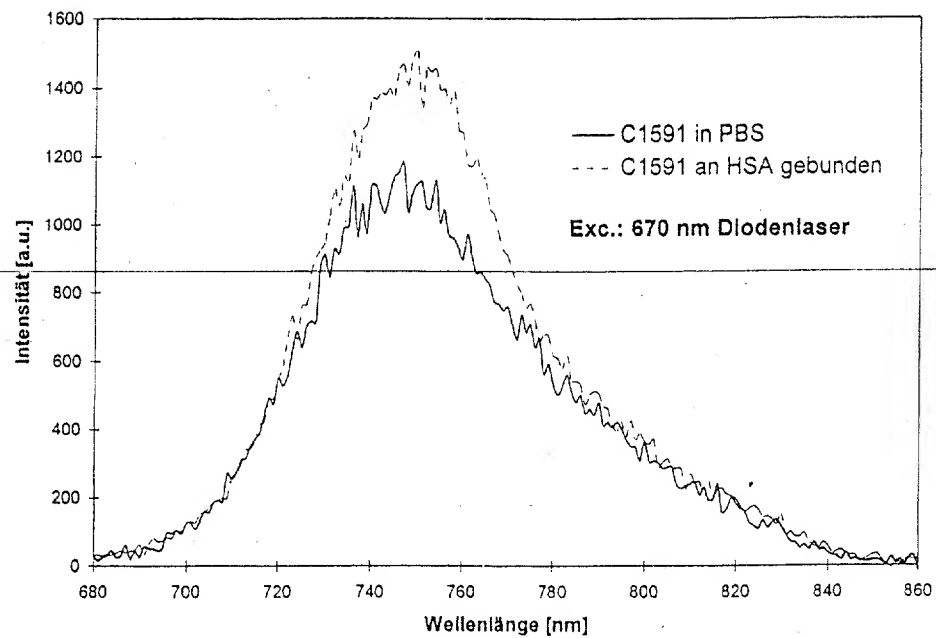


Fig. 10

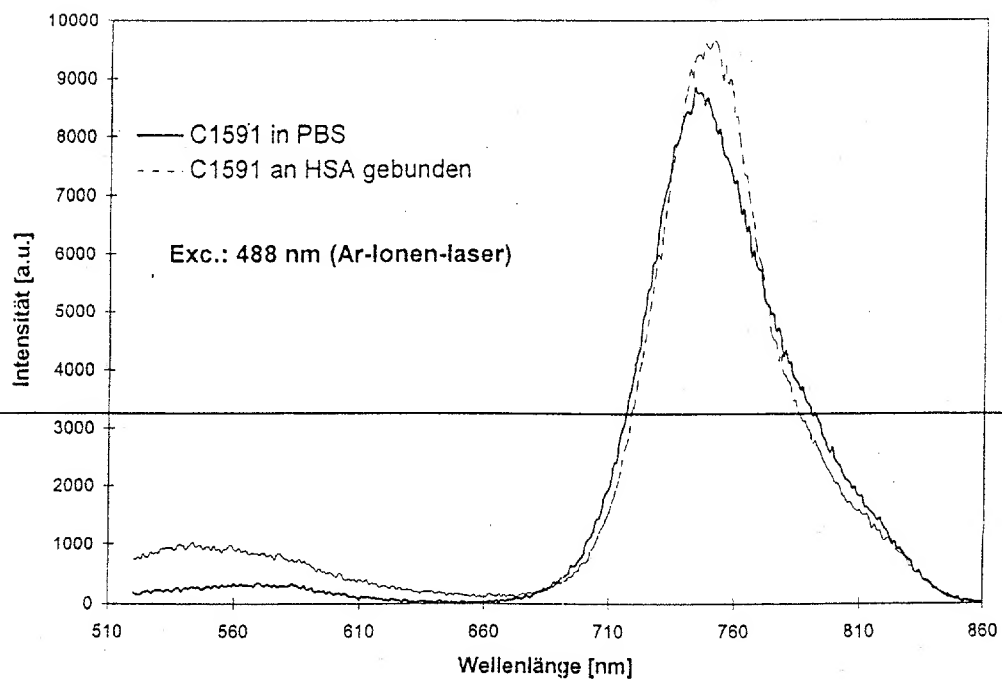


Fig. 11

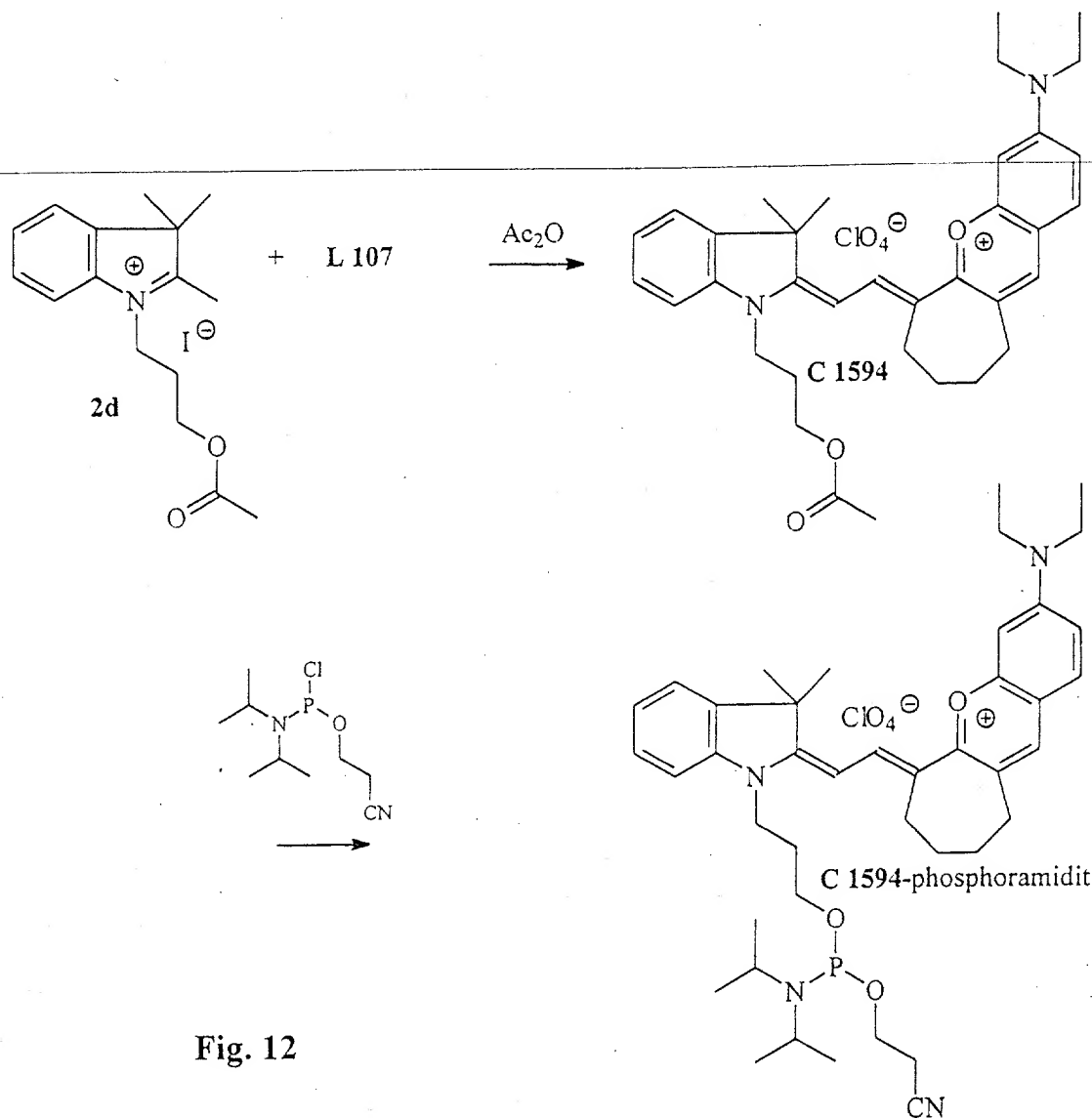


Fig. 12